



등록특허 10-2537678



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년05월30일

(11) 등록번호 10-2537678

(24) 등록일자 2023년05월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/16 (2006.01) A61K 31/53 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/1647 (2013.01)

A61K 31/53 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0145136

(22) 출원일자 2022년11월03일

심사청구일자 2022년11월03일

(56) 선행기술조사문헌

EP03932412 A1*

KR100810141 B1*

Divya Muthusamy et al., Society for Biomaterials 2022 Annual Meeting & Exposition, Poster Presentations 701(2022.04.27~30)

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

한국화학연구원

대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)

(72) 발명자

조정원

대전시 유성구 은구비남로 34, 816-701(노은동, 열매마을아파트 8단지 새미래)

이흥기

대전광역시 유성구 엑스포로123번길 34, 101동 304호(도룡동, 도룡코아루스마트리치오피스텔)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 공간

전체 청구항 수 : 총 7 항

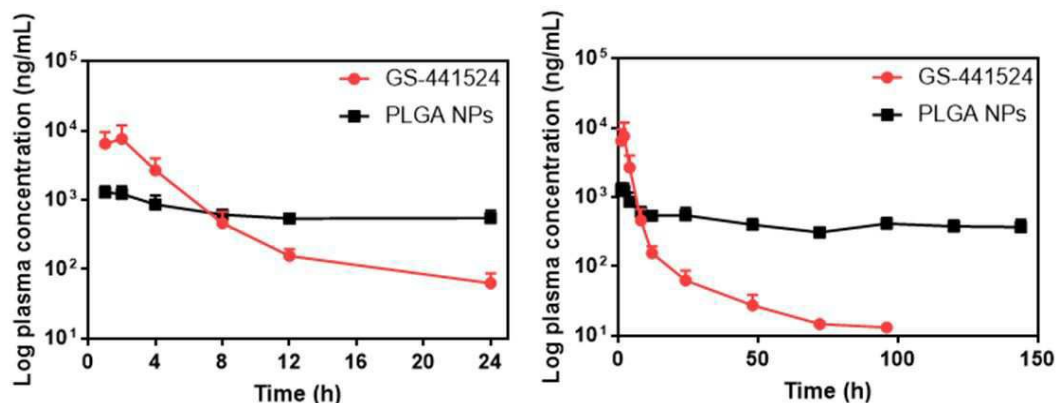
심사관 : 최홍석

(54) 발명의 명칭 GS-441524를 함유하는 서방출형 PLGA 미립구 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 GS-441524를 함유하는 서방출형 PLGA 미립구 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 구체적으로는 PLGA 미립구에 GS-441524를 봉입하여 1주 이내의 서방출할 수 있는 미립구를 제조함으로써, 안정적으로 활성성분을 지속 공급 함으로써 환자의 복약 순응도를 개선하고 약제 비용에 대한 부담을 개선할 수 있다.

대표도 - 도10



(52) CPC특허분류

A61K 9/1682 (2013.01)

A61P 31/14 (2018.01)

(72) 발명자

한수철

전북 전주시 완산구 파박골 4길 10, 106동 1704호
(효자동1가, 효자동 한신희플러스)

황정호

전북 전주시 덕진구 오공로 70, 105동 105호(중동,
우미린1단지)

진민기

대전광역시 유성구 온천로 26, 936호(봉명동, 리베
라 아이누리2)

원종희

대전광역시 유성구 유성대로821번길 31, 305호(장
대동, 해성빌라)

유혜림

경기도 수원시 장안구 장안로359번길 20,
203-501(이목동, 수원장안힐스테이트)

송보민

대전광역시 중구 목동로 70, 101동 1201호(목동,
올리브힐아파트)

윤택선

대전광역시 유성구 문화원로10번길 74, GNB 301호
(장대동)

황유림

전라북도 전주시 완산구 온고을로 119, 105동 130
5호(서신동, 신일아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1425164202
과제번호	G21S323770801
부처명	중소벤처기업부
과제관리(전문)기관명	중소기업기술정보진흥원
연구사업명	중소기업기술개발지원사업
연구과제명	약물전달시스템을 활용한 고양이 전염성 복막염 치료제 서방형 제제 개발
기 여 율	6/10
과제수행기관명	충남대학교산학협력단
연구기간	2022.04.01 ~ 2024.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711151448
과제번호	CRC21021-000
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	국가과학기술연구회
연구사업명	융합연구사업
연구과제명	첨단기술 기반 반려동물의약품 개발 및 실용화 플랫폼 구축
기 여 율	4/10
과제수행기관명	한국화학연구원부설안전성평가연구소
연구기간	2021.12.01 ~ 2024.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

GS-441524를 함유하는 서방출성 PLGA 미립구에 있어서,
상기 PLGA는 분자량이 7000 내지 13000이며, 락타이드 유닛과 글리콜라이드 유닛의 비율이 50:50이며,
상기 미립구는 GS-441524 16~25 중량% 및 PLGA 75~84 중량%로 이루어지며,
상기 GS-441524를 함유하는 서방출성 PLGA 미립구는 1일 쯤에 GS-441524를 누적 35~60% 방출하고, 7일 쯤에 GS-441524를 누적 72~95% 방출하는 것을 특징으로 하는 GS-441524를 함유하는 서방출성 PLGA 미립구.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,
상기 GS-441524를 함유하는 서방출성 PLGA 미립구는 GS-441524 25 중량%, PLGA 75 중량%로 이루어지는 것을 특징으로 하는 GS-441524를 함유하는 서방출성 PLGA 미립구.

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서,
상기 GS-441524를 함유하는 서방출성 PLGA 미립구는 입자크기가 200 내지 250 nm인 것을 특징으로 하는 GS-441524를 함유하는 서방출성 PLGA 미립구.

청구항 7

제1항, 제4항 및 제6항 중 어느 한 항의 GS-441524를 함유하는 서방출성 PLGA 미립구를 포함하는 RNA 바이러스성 감염증 치료용 조성물에 있어서,
상기 RNA 바이러스성 감염증은 SARS-CoV 바이러스, SARS-CoV-2 바이러스, MERS-CoV 바이러스, 에볼라 바이러스 및 고양이 전염성 복막염(FIP: Feline infectious peritonitis) 유발 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 바이러스에 의한 감염증인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

약제학적으로 사용가능한 GS-441524를 유기용매에 녹여 유기상을 제조하는 단계(1);
상기 1 단계의 유기상을 PLGA를 포함하는 오일상에 유화시켜 S/O 에멀전을 제조하는 단계(2);
상기 2 단계의 S/O 에멀전을 안정화제가 포함된 수상에 유화시켜 S/O/W 에멀전을 제조하는 단계(3); 및

상기 3 단계의 S/O/W 에멀전의 유기상 및 오일상을 증발시키고 동결건조하여 GS-441524 함유 PLGA 미립구를 제조하는 단계(4); 를 포함하는 것을 특징으로 하는 GS-441524를 함유하는 서방출성 PLGA 미립구의 제조방법에 있어서,

상기 PLGA는 분자량이 7000 내지 13000이며, 락타이드 유닛과 글리콜라이드 유닛의 비율이 50:50이며,

상기 S/O/W 에멀전은 GS-441524 2~14 중량%, PLGA 8~54 중량% 및 안정화제 32~90 중량%로 이루어지며,

상기 제조방법으로 제조된 미립구는 1일 제에 GS-441524를 누적 35~60% 방출하고, 7일 제에 GS-441524를 누적 72~95% 방출을 하는 것을 특징으로 하는 GS-441524를 함유하는 서방출성 PLGA 미립구의 제조방법.

청구항 10

삭제

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 S/O/W 에멀전은 GS-441524 3~15 중량%, PLGA 9~35 중량% 및 안정화제 50~88 중량%로 이루어지는 것을 특징으로 하는 GS-441524를 함유하는 서방출성 PLGA 미립구의 제조방법.

청구항 12

삭제

청구항 13

제9항에 있어서,

상기 안정화제는 분자량이 30000~70000인 폴리비닐알코올(Polyvinyl Alcohol; PVA)인 것 특징으로 하는 GS-441524를 함유하는 서방출성 PLGA 미립구의 제조방법.

청구항 14

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 GS-441524를 함유하는 서방출형 PLGA 미립구 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] GS-441524는 구조적으로 RNA 바이러스에 대한 활성이 입증된 뉴클레오사이드 유사체 항 바이러스제인 렘데시비르(Remdesiver)의 1'-cyano 치환 아데노신 유사체로 (((2R,3R,4S,5R)-2-(4-aminopyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)oxolane-2-carbonitrile 이라고 명명된다.

[0003] GS-441524는 중증급성호흡기 증후군(SARS), 코로나 바이러스 에볼라 바이러스 및 고양이 전염성 복막염(FIP: Feline infectious peritonitis)에 치료효과가 보고되고 있으며, 다양한 RNA 바이러스 복제를 억제하는 것으로 알려졌다. 그러나 GS-441524는 인간에서 약 24시간의 반감기를 가져, 체내에 1일 1회 단회 투여 주사 방법을 사용하고 있어 높은 약제 비용 및 잦은 투여방법은 환자에게 복약 순응도 및 약제 비용에 대해 부담을 가져다줄 수 있다. 특히 고양이 전염성 복막염 치료는 1일 1회 주사 투여로 12주 치료를 기본으로 하고 있어, 84일간 매일 1회 주사제 투여의 치료 과정이 고통스럽고 경제적인 부담 또한 매우 크다. 이에 따라 GS-441524를 1회 투여만으로 약물을 지속 공급하게 하여 주는 서방출형 제제의 개발이 시급한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0004] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1546381호, 봉독을 함유한 생분해성 고분자 미립구 및 이의 제조방법, 2015년08월17일, 등록.
- (특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-2237737호, 도네페질 함유 서방출성 PLGA 미립구의 제조방법, 2021년04월02일, 등록.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 본 발명의 목적은 GS-441524를 함유하는 서방출형 PLGA 미립구 및 이의 제조방법을 제공하는 데 있다.

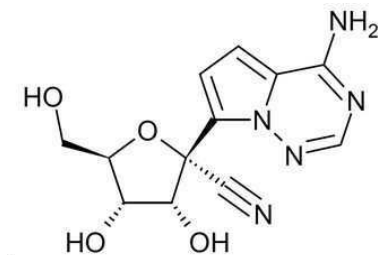
과제의 해결 수단

- [0006] 상기 과제를 해결하기 위하여 본 발명은 GS-441524를 포함하는 서방출성 PLGA 미립구 및 이의 제조방법을 제공한다.

- [0007] 본 발명은 GS-441524를 포함하는 서방출성 PLGA 미립구를 제공한다.

- [0008] 본 발명에서 GS-441524는 구조적으로 RNA 바이러스에 대한 활성이 입증된 뉴클레오사이드 유사체 항 바이러스제인 렘데시비르(Remdesiver)의 1'-cyano 치환 아데노신 유사체로 (((2R,3R,4S,5R)-2-(4-aminopyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-7-yl)-3,4-dihydroxy-5-(hydroxymethyl)oxolane-2-carbonitrile 이라고 명명되며, 하기 화학식 1의 구조를 갖는 화합물이다.

- [0009] [화학식 1]



- [0010]
- [0011] 본 발명에서 PLGA는 폴리락타이드-코-글리콜라이드(Poly(lactic-co-glycolic acid))로, 락타이드 유닛(Lactic unit)과 글리콜라이드 유닛(Glycolic unit)의 단량체가 교차하여 결합되어 있는 고분자이다. 상기 PLGA는 블록 공중합체(Block copolymer)이거나 혹은 랜덤 공중합체(Random copolymer)일 수 있다. 본 발명의 상기 PLGA에 따른 락타이드 유닛과 글리콜라이드 유닛의 조성비는 50:50 내지 95:5일 수 있으며, 바람직하게는 락타이드 유닛과 글리콜라이드 유닛의 조성비는 50:50이다.

- [0012] 본 발명에서 유기용매 또는 오일은 GS-441524 또는 PLGA를 녹일 수 있는, 물과의 혼화성이 낮은 액체 상태의 유기물질로서, 클로로포름, 에틸에테르, 디클로로메탄, 디메틸설폭사이드 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 구체적으로 디클로로메탄 또는 디메틸설폭사이드 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0013] 상기에서 안정화제는 분산상과 외부의 수상과의 계면 장력을 낮추어주는 물질로써, 생성되는 액적 간의 충돌을 통해 병합 및 응집되는 것을 방지하는 역할을 한다. 예를 들어, 젤라틴, 나트륨 올레에이트, 나트륨 스테아레이트, 나트륨 라우릴 설페이트, 소듐 도데실 설페이트(SDS) 등의 음이온성 계면활성제, Tween 80, Tween 60과 같은 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방 에스테르(Polysorbate), 폴리옥시에틸렌 피마자유 유도체 등의 비이온성 계면활성제, 폴리비닐알코올(PVA, polyvinyl alcohol), 카르복시메틸셀룰로오스, 레시틴, 히알루론산 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 구체적으로 폴리비닐알코올일 수 있다.

- [0014] 본 발명에 따른 미립구는 GS-441524 16~25 중량% 및 PLGA 75~84 중량%로 이루어질 수 있다. GS-441524가 16 중량%보다 낮거나 25 중량%보다 높은 경우, 미립자로부터 GS-441524의 방출 속도가 너무 늦거나 너무 빨라질 수 있다. 본 발명에 따른 미립구는 바람직하게는 GS-441524 25 중량%, PLGA 75 중량%로 이루어질 수 있다.

- [0015] 상기 PLGA는 분자량이 7000 내지 13000일 수 있다. 상기 PLGA의 분자량이 7000보다 낮거나 13000보다 높은 경우, 목표한 시간보다 약물 방출 속도가 빨라지거나 지연될 수 있다. 상기 PLGA는 락타이드 유닛과 글리콜라이드

드 유닛의 비율은 50:50이다. 상기 락타이드 유닛과 글리콜라이드 유닛의 비율에서 락타이드 유닛 비율이 증가할수록, 약물이 지연방출된다.

- [0016] 상기 서방출성 PLGA 미립구는 입자크기가 200 내지 250 nm일 수 있다. 상기 서방출성 PLGA 미립구는 입자크기가 250 nm보다 큰 경우, 미립구가 불안정할 수 있으며, 보관이 용이하지 않을 수 있다. 바람직하게는 서방출성 PLGA 미립구의 입자크기는 205 내지 220 nm이다.
- [0017] 본 발명에서 서방출은, 약물의 방출 기전을 조절하여 체내에서 장기간에 걸쳐 서서히 방출되는 것을 의미한다. 구체적으로 본 발명의 서방출은, 일반적 농도구배에 따른 단순 확산(Fick's law)으로만 조절되지 않고, 상기 단 순확산과 고분자 매트릭스에 의한 용출조절 효과(Higuchi model)에 의한 약물의 방출 기전이 서로 병합된 형태 로 나타나는 것일 수 있으며, 본 발명에서는 투입 약물이 1일 동안 35~60%, 7일 후, 72~95%로 방출되는 것일 수 있다.
- [0018] 본 발명은 GS-441524 함유 서방출성 PLGA 미립구를 제공하며, 상기 미립구는 생체 내 7일간 GS-441524 주입량 대비 90% 이상의 방출 특성을 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0019] 상기 GS-441524 함유 서방출성 PLGA 미립구는 입자크기가 200 내지 250 nm인 것을 특징으로 하며, 이에 따라 안정적인 주사제형으로 적용할 수 있다.
- [0020] GS-441524 함유 서방출성 PLGA 미립구를 포함하는 RNA 바이러스성 감염증 치료용 조성물을 제공한다.
- [0021] 본 발명에서 RNA 바이러스성 감염증은 인플루엔자 바이러스, 코로나 바이러스나 레오바이러스 및 레트로바이러 스 등 RNA를 유전자로 갖는 바이러스에 의한 감염증을 말하며, 구체적으로는 에이즈바이러스, 에볼라바이러스, 독감바이러스, 코로나바이러스 또는 고양이 복막염 유발 바이러스에 의한 감염증일 수 있으며, 더욱 구체적으로 는 SARS-CoV 바이러스, SARS-CoV-2 바이러스, MERS-CoV 바이러스, 에볼라 바이러스 및 고양이 전염성 복막염 (FIP: Feline infectious peritonitis) 유발 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 RNA 바이러 스에 의한 감염증이다.
- [0022] 본 발명은 상기 GS-441524 함유 서방출성 PLGA 미립구 및 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 RNA 바이 러스성 감염증 예방 또는 치료용 약학 조성물로 제공될 수 있다.
- [0023] 상기 GS-441524 함유 서방출성 PLGA 미립구는 전체 약학 조성물 총 중량에 대하여 바람직하게는 0.001~83중량%, 더 바람직하게는 0.001~80중량%, 가장 바람직하게는 0.001~75중량%로 하여 첨가될 수 있다.
- [0024] 상기 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 액제, 에 어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 약학적 조 성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합 제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제, 감미제, 산미제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제에는 본 발명의 GS-441524 함유 서방출성 PLGA 미립구에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토즈, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제, 산미제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸 올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트 윈(tween)-61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여 경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여 량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01mg/kg/일 내지 대략 500mg/kg/일의 범위이다. 바람직한 투여량은 0.1mg/kg/일 내지 200mg/kg/일이며, 더 바람직한 투여량은 1mg/kg/일 내지 200mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명

의 범위를 한정하는 것은 아니다.

- [0026] 본 발명의 약학적 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사 및 피부 도포에 의해 투여될 수 있으며, 바람직하게는 주사로 투여될 수 있다.
- [0027] 본 발명은 약제학적으로 사용가능한 GS-441524를 유기용매에 녹여 유기상을 제조하는 단계(1);
- [0028] 상기 1 단계의 유기상을 PLGA를 포함하는 오일상에 유화시켜 S/O 에멀전을 제조하는 단계(2);
- [0029] 상기 2 단계의 S/O 에멀전을 안정화제가 포함된 수상에 유화시켜 S/O/W 에멀전을 제조하는 단계(3); 및
- [0030] 상기 3 단계의 S/O/W 에멀전의 유기상 및 오일상을 증발시키고 동결건조하여 GS-441524 함유 PLGA 미립구를 제조하는 단계(4);
- [0031] 를 포함하는 것을 특징으로 하는 GS-441524 함유 서방출성 PLGA 미립구의 제조방법을 제공한다.
- [0032] 상기 S/O/W 에멀전은 GS-441524 2~14 중량%, PLGA 8~54 중량% 및 안정화제 32~90 중량%로 이루어질 수 있으며, 바람직하게는 상기 S/O/W 에멀전은 GS-441524 3~15 중량%, PLGA 9~35 중량% 및 안정화제 50~88 중량%로 이루어진다.
- [0033] 상기 안정화제는 분자량이 30000~70000인 폴리비닐알코올(Polyvinyl Alcohol; PVA)일 수 있다. 상기 폴리비닐알코올의 분자량이 30000보다 작거나 70000보다 큰 경우 미립구의 입자 크기가 250 nm보다 감소하거나 증가하고 미립구의 안정성이 떨어져 주사제 등의 제제 활용성이 떨어질 수 있다.
- [0034] 상기 GS-441524 함유 서방출성 PLGA 미립구의 제조방법으로 제조된 미립구는 GS-441524 25 중량%, PLGA 75 중량%로 이루어질 수 있으며, 1일 췌에 GS-441524를 누적 35~60% 방출하고, 7일 췌에 GS-441524를 누적 72~95% 방출할 수 있다.

발명의 효과

- [0035] 본 발명은 GS-441524를 함유하는 서방출형 PLGA 미립구 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 구체적으로는 PLGA 미립구에 GS-441524를 봉입하여 1주 이내 GS-441524를 누적 72~95%의 서방출을 할 수 있는 미립구를 제조함으로써, 안정적으로 활성성분을 지속공급 함으로써 환자의 복약 순응도를 개선하고 약제 비용에 대한 부담을 개선할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0036] 도 1은 본 발명에 따른 실시예 1~13(F1~F13)의 시험관 내 약물 방출 패턴 그래프이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 실시예 1~13(F1~F13)의 1일 및 7일째 누적 약물 방출률을 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 PLGA 75:25를 이용하여 제조된 미립구의 시험관 내 약물 방출 패턴 그래프이다.
- 도 4는 본 발명에 따른 실시예 3(F3)의 미립구 형성을 확인한 주사전자현미경 사진이다.
- 도 5는 GS-441524, 안정화제 폴리비닐알코올 (PVA), PLGA의 원료 및 GS-441524가 함유되거나(PLGA NPs(F3)) 함유되지 않은 PLGA 미립구(Blank-PLGA NPs)의 시차 주사 열량 그래프이다.
- 도 6은 GS-441524, 안정화제 폴리비닐알코올 (PVA), PLGA의 원료 및 GS-441524가 함유되거나(PLGA NPs(F3)) 함유되지 않은 PLGA 미립구(Blank-PLGA NPs)의 적외선 분광 그래프이다.
- 도 7은 GS-441524, 안정화제 폴리비닐알코올 (PVA), PLGA의 원료 및 GS-441524가 함유되거나(PLGA NPs(F3)) 함유되지 않은 PLGA 미립구(Blank-PLGA NPs)의 X-회절 분석 그래프이다.
- 도 8은 GS-441524 및 GS-441524가 함유되거나(PLGA NPs) 함유되지 않은 PLGA 미립구(Blank-PLGA NPs)의 세포 독성 평가 결과 그래프이다.
- 도 9는 GS-441524의 정량분석을 위한 LC-MS/MS의 GS-441524 표준검량곡선이다.
- 도 10은 실시예 3(F3)(PLGA-NP) 및 대조군(GS-441524)의 랫드에 피하주사한 후 시간에 따른 혈중농도의 변화를 비교한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 본 발명자들은 GS-441524의 서방출 제제를 개발하기 위한 연구를 진행한 결과, GS-441524를 함유하는 PLGA 미립구를 개발하였으며, 시험관 내에서 GS-441524가 1주일간 지속 방출됨을 확인하였고, 더 나아가 생체 내에서 5일간 지속 방출할 수 있는 PLGA 미립구를 개발하고 본 발명을 완성하였다.

[0038] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있으며, 여기서 소개되는 내용은 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.

<실험예 1. PLGA의 양, 안정화제의 비율 및 수상 대 유상의 비율에 따른 미립구제조 (S/O/W형)>

1.1 미립구제조의 제조 (S/O/W형)

[0041] 하기 표 1의 조건으로 PLGA 75~125 mg을 디클로로메탄(DCM) 6mL에 완전히 용해시켜 오일상을 제조하고, GS-441524 25mg을 디메틸설폭사이드(DMSO) 3mL에 용해시켜 유기상을 제조하였다. 이후, 유기상을 오일상에 첨가한 후, 초음파분산기를 통해 유화시켜 S/O 에멀전을 제조하였다. 상기 제조된 S/O 에멀전을 하기 표 1에 기재되어 있는 수상 대 유상 비율로, 설정된 폴리비닐알코올(안정화제) 0.5~3%가 함유된 수상 12~36mL에 적가하고 초음파분산기를 통해 유화시켜 S/O/W 에멀전을 제조하였다. 이후 상기 제조된 S/O/W 에멀전을 12시간 동안 자기교반기 700 rpm으로 교반하여 유기상 및 오일상을 증발시키면서 경화시키고 이를 15000 rpm으로 12분 동안 원심분리하여 미립구가 포함된 펠렛을 얻었다. 이후 상기에서 얻은 미립구가 포함된 펠렛을 증류수로 3회 세척한 뒤 -70℃에서 동결한 다음, 동결건조기를 통해 24시간 동안 건조하여 GS-441524가 함유된 PLGA 미립구를 제조하였다. 상기 증류수로 세척하는 과정에서 대부분의 안정화제가 제거되기 때문에 건조 후 미립구는 GS-441524 및 PLGA로 구성되게 된다.

표 1

실시예	GS-441524 양 (mg/3mL)	PLGA 양 (mg/6mL)	PVA 양	
			PVA 비율 (w/v%)	수상의 양 (mL)
1 (F1)	25	75	0.5	24
2 (F2)	25	75	1.75	12
3 (F3)	25	75	1.75	36
4 (F4)	25	75	3	24
5 (F5)	25	100	0.5	12
6 (F6)	25	100	0.5	36
7 (F7)	25	100	1.75	24
8 (F8)	25	100	3	12
9 (F9)	25	100	3	36
10 (F10)	25	125	0.5	24
11 (F11)	25	125	1.75	12
12 (F12)	25	125	1.75	36
13 (F13)	25	125	3	24

1.2 PLGA 미립구 입자크기 및 약물봉입률 확인

[0044] 상기 표 1의 실시예 1~13(F1~F13)에 따른 PLGA 미립구의 입자크기 및 약물봉입률을 확인하였다. 상기 실험예 1.1의 제조과정 중, GS-441524가 함유된 PLGA 미립구를 디메틸설폭사이드(DMSO)를 통해 봉입된 약물을 추출하여 원심분리 후, 상등액을 취하여 LC-MS/MS 시스템으로 정량하여, 하기 식을 통해 봉입효율을 계산하고 이를 표 2에 나타내었다.

[식]

봉입 효율 (%) = 입자 안에 포함된 약물 양 / 입자 제조 시 사용된 약물 양 × 100

또한, 상기에서 제조된 실시예 1~13(F1~F13)의 조건으로 제조되어 동결건조된 미립구를 증류수에 분산시킨 후 입도분석기(Particle size analyser)로 미립구의 평균 입자 크기를 측정하고 이를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

실시에	입자크기 (nm)	약물봉입률 (%)	7일째 약물 방출 (%)
F1	209.8 ± 9.1	72.6 ± 1.3	91.5 ± 1.1
F2	214.6 ± 6.6	67.1 ± 3.4	95.7 ± 1.8
F3	215.8 ± 5.1	77.7 ± 0.8	92.4 ± 3.8
F4	218.9 ± 1.9	75.1 ± 2.7	90.2 ± 1.7
F5	222.9 ± 3.3	72.6 ± 1.0	83.4 ± 1.7
F6	226.8 ± 4.8	80.7 ± 0.9	83.5 ± 1.8
F7	223.4 ± 1.5	75.8 ± 1.6	85.0 ± 1.8
F8	228.7 ± 3.3	75.4 ± 1.2	79.7 ± 1.6
F9	230.3 ± 7.5	81.7 ± 1.3	76.8 ± 4.4
F10	231.9 ± 6.9	80.6 ± 0.9	73.5 ± 0.2
F11	230.3 ± 7.4	79.7 ± 1.3	77.2 ± 1.7
F12	234.4 ± 7.5	86.0 ± 2.1	72.0 ± 4.0
F13	240.8 ± 6.3	83.8 ± 3.3	74.7 ± 3.3

상기 표 2에서 보는 바와 같이, PLGA 미립구는 PLGA 양에 따라 입자크기 및 약물 방출에 많은 영향을 받았다. 가장 적은 양의 PLGA를 사용한 실시예 F1에서 가장 작은 209.8 nm의 입자크기를 갖는 미립구가 제조되었고, 약물봉입률은 실시예 F12에서 86%로 가장 높은 약물봉입률을 갖는 것을 확인하였다.

1.3 PLGA 미립구의 시험관 내 약물 방출 패턴

상기 표 1의 실시예 1~13(F1~F13)의 7일간 약물 방출 패턴을 확인하였다. 상기 실시예 1~13(F1~F13)의 동결건조된 PLGA 미립구 각 5mg을 2mL 튜브에 넣고, 계면활성제인 Tween 80 1%를 함유한 pH 7.4 PBS (Phosphate-buffered saline) 용액 1mL를 넣고 혼합하여 용출액으로 사용하였다. 상기 튜브를 37℃ 진탕 배양기에서 100 rpm으로 교반하면서, 1일 1회, 정해진 매 시간마다 원심분리하여 상등액을 100 µL 씩 취하고 동량의 용출액을 보충하였다. 상기에서 취한 용출액 내 GS-441524의 농도를 LC-MS/MS 정량법으로 측정하고 누적 방출량을 도 1에 나타내었다. 또한 1일째 및 7일째 GS-441524의 누적 방출량을 도 2A 및 도 2B에 나타내고, 입자크기 및 봉입률과 비교하기 위하여 7일째 누적 방출량을 상기 표 2에 함께 나타내었다.

도 1 및 도 2에서 보는 바와 같이, 실시예 1~13(F1~F13) 모두에서 약물 방출 패턴은 1일째에 35~60%의 약물 방출을 확인하였고, 7일 후, 72~95%로 방출됨을 확인하였다. 특히 PLGA 75mg을 사용한 실시예 1~4(F1~F4)는 7일간 누적방출 90% 이상에 도달하였다. 상기 약물 방출 결과를 고려하여, 7일간 누적 방출 90% 이상인 실시예 1~4 중, 봉입률이 가장 높은 실시예 3을 이후 실험에 사용하였다.

1.4 PLGA 75:25 미립구의 시험관 내 약물 방출 패턴

본 발명에서 사용한 합성고분자인 PLGA(Poly lactide-co-glycolide)는 락타이드 유닛의 PLA(Polylactic Acid)와 글리콜라이드 유닛의 PGA(Polyglycolic acid)의 공중합체로 이루어진 고분자 화합물로, 생분해성, 낮은 독성으로 인해 생체 적용되는 제제에 사용되고 있다. 상기 실험예에서 사용한 PLGA는 PLA와 PGA의 단량체 비율이 50:50의 공중합체를 사용하였다. 따라서 PLGA 75:25에서도 동일한 약물 방출 특성을 나타내는지 확인하였다.

상기 실시예 3(F3)과 동일한 방법으로 PLGA만을 PLGA 75:25로 교체하여 GS-441524를 포함하는 PLGA 미립구를 제조한 다음, 상기 실험예 1.3과 동일한 방법으로 6일간의 GS-441524 누적방출량을 측정하여 도 3에 나타내었다. 도 3에서 보는 바와 같이 PLGA 75:25를 사용하는 경우, 6일간 누적 약물 방출량은 50%에 미치지 못하였으며, 이는 PLGA 75:25를 사용 시, 7일째에도 90%에 도달할 수 없음을 나타낸다. 이에 따라 이후 실험은 PLGA 50:50을 사용하여 실시하였다.

<실험예 2. 최적화된 GS-441524가 함유된 PLGA 미립구 평가>

상기 실험예 1을 통해 최적화된 조성으로 GS-441524 25mg/3mL, PLGA 75mg/6mL, 안정화제 폴리비닐알코올 1.75 w/v%가 포함된 수상 36mL을 사용하여 실시예 3(F3)의 PLGA 미립구를 제조하고 제제 특성을 평가하였다.

2.1 PLGA 미립구 형성 확인

본 발명에 따라 제조된 실시예 3(F3)의 PLGA 미립구는 주사전자현미경(Field Emission Scanning Electron

Microscope, JSM-7100F)으로 확인하여 도 4에 나타내었다. 도 4에서 보는 바와 같이, 제조된 실시예 F3의 미립구는 약 200~250nm의 균일한 구형의 입자를 형성하는 것을 확인하였다.

2.2 PLGA 미립구의 시차 주사 열량 측정 (Differential scanning calorimetry, DSC)

본 발명에 따른 상기 실시예 3(F3)의 GS-441524 함유된 PLGA 미립구의 조성물의 고유 융점을 확인함으로써 약물의 봉입여부를 확인하였다. GS-441524, 폴리비닐알코올 (PVA) 및 PLGA의 단독 물질, 그리고 GS-441524가 함유되지 않은 PLGA 미립구 (Blank-PLGA NPs)와 본 발명에 따른 GS-441524 함유된 PLGA 미립구(F3)를 시차주사열량기 (DSC N-650, SCINCO)를 이용하여 열적 전이와 관련된 온도를 측정하고 그 결과를 도 5에 나타내었다.

도 5에서 확인된 결과와 같이, GS-441524는 약 275℃ 부근에서 물질 고유의 흡열피크가 확인되었으며, PLGA의 물질 고유의 흡열피크는 약 41℃ 부근에서 관찰되었다. 실시예 3(F3)의 PLGA 미립구에서 흡열피크는 48℃에서 관찰되었고, 함유된 GS-441524의 흡열피크는 관찰되지 않았다. 즉, PLGA 미립구 제조 후 무정형 상태 또는 PLGA와 결합으로 인해 흡열피크가 사라진 것을 확인하였다. 또한 안정화제인 폴리비닐알코올은 약 190℃에서 무정형에 가까운 흡열피크가 관찰되었지만 실시예 3(F3)의 미립구에서는 관찰되지 않아 제조단계에서 제거됨을 확인하였다. 이와 같은 결과로 보아, 본 발명에서 제조된 PLGA 미립구가 GS-441524를 무정형 형태로 봉입하고 있음을 확인하였다.

2.3 PLGA 미립구의 적외선 분광 측정 (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FT-IR)

본 발명에 따른 상기 실시예 3(F3)의 GS-441524 함유된 PLGA 미립구의 봉입여부 및 조성물간의 상호작용을 확인하기 위하여 GS-441524, 폴리비닐알코올 (PVA) 및 PLGA의 단독 물질, 그리고 GS-441524가 함유되지 않은 PLGA 미립구 (Blank-PLGA NPs)와 본 발명에 따른 GS-441524 함유된 PLGA 미립구(F3)를 IR 스펙트럼을 적외선 분광기 ALPHA-P, Bruker, Massachusetts, USA)로 분석하여 도 6에 나타내었다. 도 6에 나타난 결과와 같이, 활성 성분, 원료 및 PLGA 미립구의 구조가 확인되었고, GS-441524와 다른 물질 간의 상호작용은 없었으며, PLGA 미립구(F3)에서 GS-441524의 IR 패턴이 확인되지 않음에 따라 PLGA 미립구안에 봉입되었다는 것을 확인하였다.

2.4 PLGA 미립구의 X-선 회절분석 측정 (X-ray Diffractometer, XRD)

본 발명에 따른 상기 실시예 F3의 GS-441524 함유된 PLGA 미립구의 표면 결정형태를 통한 약물의 봉입 여부를 확인하였다. GS-441524, 폴리비닐알코올 (PVA) 및 PLGA의 단독 물질, 그리고 GS-441524가 함유되지 않은 PLGA 미립구 (Blank-PLGA NPs)와 본 발명에 따른 GS-441524 함유된 PLGA 미립구(F3)를 X-선 회절분석을 실시하고 그 결과를 도 7에 나타내었다. X-선 회절분석은 X-선 회절분석기 (Multipurpose X-ray Diffractometer, D8 ADVANCE, Bruker axs, Massachusetts, USA)로 분석하였다. 도 7에 나타난 결과와 같이, GS-441524의 표면은 결정질 형태의 패턴으로 측정되었다. 그러나 PLGA 미립구 (실시예 F3)은 무정형 형태의 패턴으로 관찰된 것으로 보아 GS-441524가 무정형 상태로 PLGA 미립구 안에 봉입되어 있음을 확인하였다.

<실험예 3. 최적화된 GS-441524가 함유된 PLGA 미립구의 세포독성 평가>

본 발명에 따른 상기 실시예 3의 GS-441524 함유된 PLGA 미립구의 세포독성을 확인하였다.

고양이 신장세포(CRFK cell)는 DMEM 배지(Dulbecco modified Eagle medium)에 10% 소태아혈청과 1% 페니실린/스트렙토마이신 (100 unit/mL 단위)을 넣은 배지에서 온도 37℃, CO₂ 5% 조건으로 배양하였다. 시험 하루 전 고양이 신장세포(CRFK cell)를 2×10^4 로 수로 96웰 플레이트 각 웰에 배양하였다. 하루 뒤, 각 웰에 있는 배지를 제거하고, GS-441524, GS-441524가 함유되지 않은 PLGA 미립구(Blank-PLGA NPs) 또는 본 발명에 따른 GS-441524가 함유된 PLGA 미립구(PLGA-NPs)를 5000 μ M부터 1 μ M 까지 항생제 및 소태아혈청 (Fetal Bovine Serum)이 포함되어 있지 않은 배지에 희석하여 각 웰당 100 μ L씩 가해준 뒤, 24시간 동안 온도 37℃, CO₂ 5% 조건으로 배양하였다. 24시간 후, 각 웰에 5mg/mL 티아졸릴 블루 테트라졸리움 브롬화물(Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide) 수용액을 30 μ L 씩 가해 준 뒤, 3시간 동안 온도 37℃, CO₂ 5% 조건으로 배양하였다. 그 후, 각 웰에 있는 배지를 제거한 뒤, PBS (Phosphate-buffered saline)로 2회 세척한 후, 각 웰에 200 μ L의 디메틸설폭사이드를 가해준 다음, 플레이트리더기를 이용하여 UV (Ultraviolet) 565nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 이후 결과를 무처리 대조군에 대한 세포 생존율로 환산하고 그 결과를 도 8에 나타내었다.

도 8에서 보는 바와 같이, GS-441524의 IC50은 849.9 μ M로 측정되었고, GS-441524가 함유되지 않거나 함유된 PLGA 미립구의 독성은 가장 높은 약물 농도인 5000 μ M에서도 60% 이상의 세포 활성도(%)를 나타내어 GS-441524 대비 PLGA미립구의 독성이 현저하게 낮은 것을 확인하였다. 이와 같은 결과는 PLGA의 특성인 낮은 독성에 의한

것일 수 있다. 또한 활성성분이 봉입되어 세포에 직접적인 영향을 미치지 않았고, PLGA 미립구 (실시에 F3)의 초기방출률이 50%로 나타나 GS-441524 단독 대비 약물이 절반정도 세포에 가해짐에 따른 것으로 보여진다.

<실험예 4. GS-441524 PLGA 미립구의 약물동태학적 평가>

본 발명에 따른 상기 실시예 F3의 GS-441524 함유된 PLGA 미립구의 약물동태학적 평가를 실시하였다. 실험동물로 랫드를 실험군 및 대조군 각 5마리씩 무작위로 나누고, 7일 동안 일정량의 고체사료 및 물을 공급하면서 동일한 조건으로 사육하였다. 실험 12시간 전 랫드를 절식시킨 후, 실험에 사용하였다.

실험군에는 본 발명의 실시예 F3의 PLGA 미립구를 사용하여 GS-441524 28mg/kg에 해당하는 용량을 피하 주사하였으며, 대조군에는 GS-441524 단독 물질을 GS-441524 28mg/kg로 피하주사하였다. 랫드에 피하주사 후, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120 및 144시간 후에 약 300 μ L의 혈액을 안와정맥을 통해 각각 채취하였다. 얻은 시료를 15000 rpm, 5분간 원심분리하여 혈장을 분리한 뒤, -70℃에서 분석전까지 보관하였다.

혈장 시료 전처리 과정은 제단백법을 사용하였다. 혈장 시료 100 μ L를 취하여 200 μ L의 메탄올 (내부표준물질 10ng/mL 베라파밀)을 가하고, 10분간 혼합하여 추출한 뒤, 17000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상등액을 취하여 LC-MS/MS를 통해 혈액 내 GS-441524를 정량하였다.

하기 표 3은 LC-MS/MS의 GS-441524 분석 조건이며, 도 9는 GS-441524를 정량하기 위해 표준물질의 설정한 각 농도 범위 (0~800 ng/mL)를 3회 반복 분석하여 얻은 표준검량곡선이다.

표 3

GS-441524의 LC-MS/MS 분석법			
장비	Agilent Technologies 6495 Triple Quad LC/MS		
컬럼	YMC-TriartC18 column (75 × 3.0 mm, 1.9 μ m)		
이동상 조건	(A) 0.1% 포름산 수용액 (B) 0.1% 포름산 아세트나이트릴		
	시간 (분)	A%	B%
	0	99	1
	0.1	99	1
	2	40	60
	2.5	10	90
	3.5	10	90
	3.7	99	1
	4.5	99	1
주입량	5 μ L		
유속	0.4 mL/min		
MRM	m/z 292.2 → 163.0, Positive mode		
컬럼 온도 (°C)	40		
Collision energy (eV)	30		
Gas temperature (°C)	290		
Gas flow rate (L/min)	18		
Nebulizer pressure(psi)	40		
Capillary Positive	4500V		

상기에서 얻은 혈액 내 GS-441524 농도를 도 10에 나타내고, 이를 토대로 최고 혈중 농도(C_{max}), 혈중 농도 면적 (AUC_{0-144h}), 반감기($T_{1/2}$), 겉보기 분포용적(V_z), 청소율(CI), 상대적 생체이용률(%)을 WinNonlin을 사용하여 계산하여 표 4에 나타내었다.

표 4

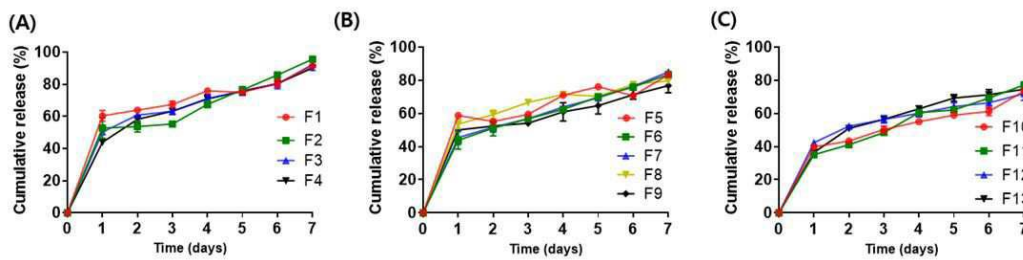
약동학적 파라미터	구분	
	대조군 (GS-441524)	PLGA-NPs (실시에 3)

$C_{\max}$ (ng/mL)	8166 ± 4077	1310 ± 259
$AUC_{0 \rightarrow 144}$ (hr · ng/mL)	31615 ± 14328	59222 ± 13190
$T_{1/2}$ (h)	61.54 ± 66.18	129.62 ± 53.97
V_z (mL/kg)	81261 ± 84077	41419 ± 5187
Cl (mL/h/kg)	1039 ± 559	264 ± 146
상대적 생체이용률 (%)	-	187 ± 42

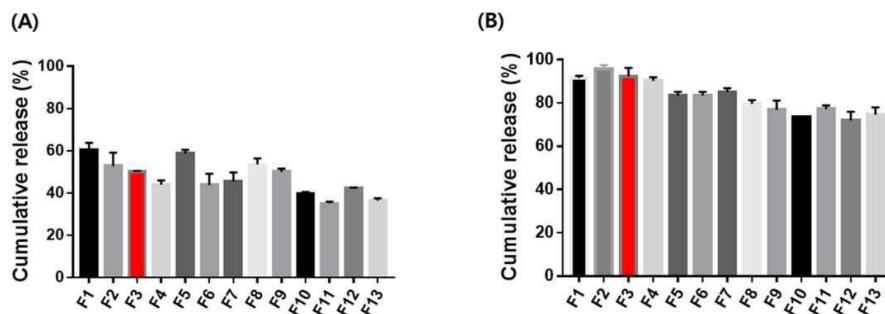
[0079] 표 4 및 도 10에서 확인되는 바와 같이, 본 발명의 실시예 3(F3)은 대조군과 비교하여 $AUC_{0 \rightarrow 144}$ 는 약 53%, $T_{1/2}$ 은 약 47% 증가하였고, Cl (청소율)은 약 25% 감소하여 활성성분인 GS-441524가 생체 내에서 지속공급됨을 확인하였다.

도면

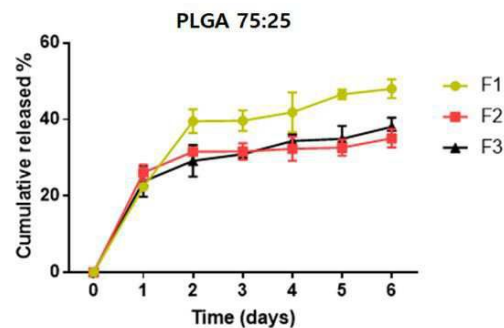
도면1



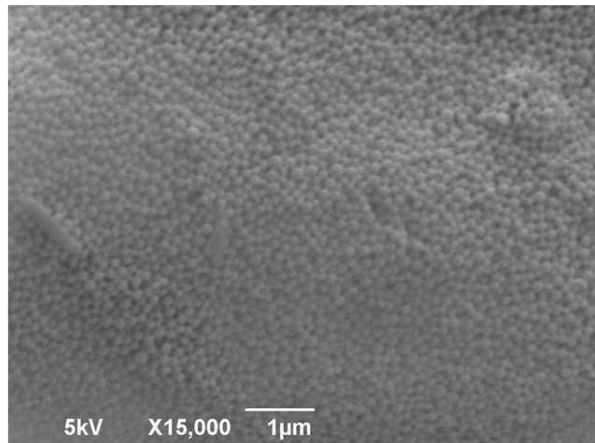
도면2



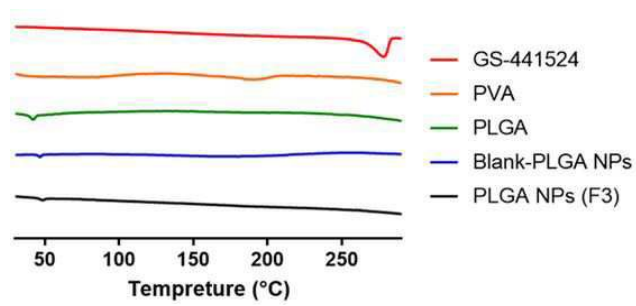
도면3



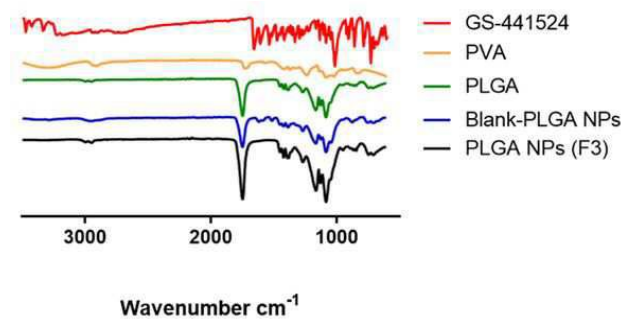
도면4



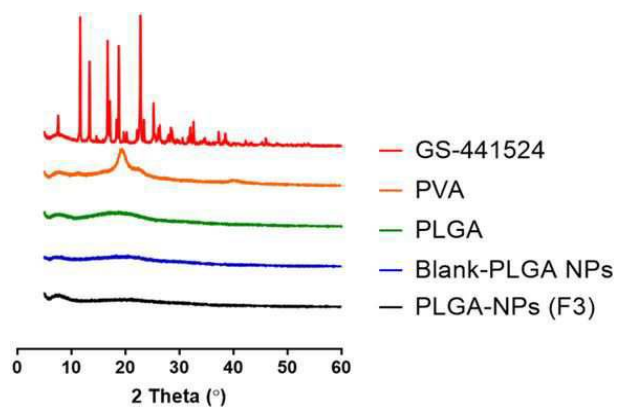
도면5



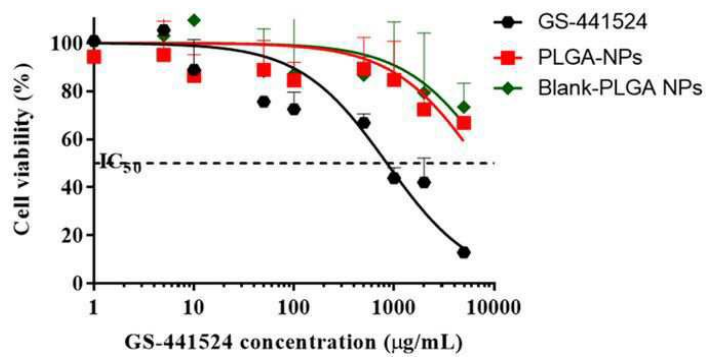
도면6



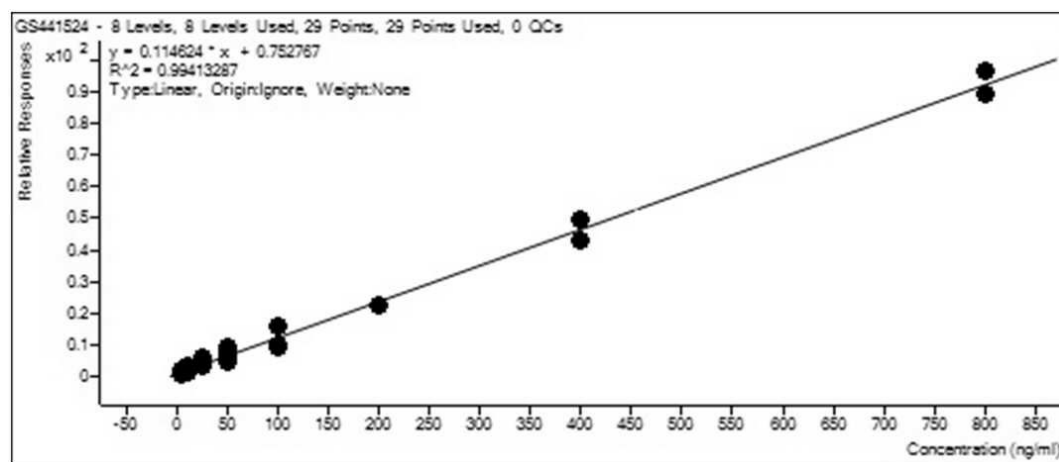
도면7



도면8



도면9



도면10

